

**UJI AKTIVITAS ANTIPLASMODIUM EKSTRAK KLOOROFORM,
METANOL DAN AIR BUAH PARE (*Momordica charantia*, Linne)
PADA KULTUR *Plasmodium falciparum* RESISTEN KLOOROKUIN
SECARA *IN VITRO***

**IN VITRO ANTIPLASMODIAL ACTIVITY OF EXTRACT
CHLOROFORM, METHANOL, AND WATER OF *Momordica charantia*,
Linne TO THE CULTURE OF *Plasmodium falciparum*'s CHLOROQUIN
RESISTEN**

Prima Restikasari¹⁾, Wahyu Widyaningsih¹⁾, Mustofa²⁾

*Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan
Jl Prof. Dr. Supomo, Telp. (0274) 379418*

Abstrak

Penyakit malaria yang masih menjadi masalah kesehatan utama di Indonesia. Buah pare secara tradisional digunakan sebagai obat malaria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiplasmodium ekstrak kloroform, metanol dan air buah pare (*Momordica charantia*, Linne) pada kultur *Plasmodium falciparum* resisten klorokuin (FCR-3) secara *in vitro*. Buah pare kering diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut kloroform, metanol dan air. Sebagai kontrol positif digunakan meniran dan kontrol negatif tanpa perlakuan. Pemeriksaan plasmodium dilakukan secara mikroskopik dengan pewarnaan Giemsa 20%. Jumlah plasmodium dalam 1000 eritrosit dihitung oleh 3 orang sukarelawan secara independen setelah inkubasi selama 48 jam. Kadar yang digunakan adalah 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml. Hasil penelitian aktivitas antiplasmodium dari ekstrak kloroform, metanol dan air dihitung dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} ekstrak kloroform, metanol dan air pare berturut-turut 45,07 µg/ml, 92,58 µg/ml dan 454,23 µg/ml. Ekstrak kloroform buah memiliki IC_{50} paling kecil dibanding ekstrak metanol dan air buah pare yang berarti aktivitas antiplasmodiumnya paling besar.

Kata kunci : antiplasmodium, ekstrak kloroform, metanol dan air buah pare, *Plasmodium falciparum* resisten klorokuin (FCR-3)

2) Fakultas Kedokteran UGM

Abstract

Malaria is the main problem of health in Indonesia. Pare (Momordica charantia, Linne) is used for medicine of malaria traditionally. This research was conducted to evaluate the antiplasmodial activity of three extract (chloroform, methanol, and water) to the culture of Plasmodium falciparum's chloroquin resisten (FCR-3). The dried of Momordica charantia, Linne was extracted by maceration method using chloroform, methanol, and water substance. In this research Meniran was used as positive control and the negative control used without treatment. The microscopic Plasmodium was assayed by the Giemsa 20 % coloring method. The Plasmodium's amount in 1000 eritrocit was counted by independent three counter person after the incubation for 48 hours. The concentration that used were 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml. The antiplasmodial activity was performed as IC₅₀ value. The IC₅₀ value of the chloroform, methanol dan water extract of Momordica charantia, Linne are 45,07 µg/ml, 92,58 µg/ml, and 454,23 µg/ml, respectively. The chloroform extract of Momordica charantia, Linne has the highest antiplasmodial activity.

Keywords : antiplasmodial, chloroform, methanol and water extract of Pare, Plasmodium falciparum (FCR-3)

Pendahuluan

Malaria adalah penyakit infeksi parasit utama di dunia. Penderita penyakit malaria pertahunnya hampir 170 juta orang. Penyakit ini juga berjangkit di hampir 103 negara, terutama di negara-negara di daerah tropik pada ketinggian antara 400-3000 meter dari permukaan laut (dpl) dengan kelembaban udara tidak kurang dari 60% (Mursito, 2002).

Di Indonesia, malaria masih menjadi masalah kesehatan utama. Penyakit ini berjangkit di semua pulau di Indonesia, mulai dari dataran rendah hingga dataran tinggi, baik di kota maupun di desa. Sebagian penduduk di 20 provinsi di Indonesia terjangkit penyakit malaria. Lebih dari 40 juta penduduk Indonesia bermukim di daerah endemis malaria, sekitar 11 juta di antaranya tinggal di Jawa dan Bali (Mursito, 2002). Berdasarkan survei kesehatan rumah tangga tahun 1995 diperkirakan 15 juta penduduk Indonesia menderita malaria dan 30.000 di antaranya meninggal dunia.

Morbiditas (angka kesakitan) malaria sejak 3 tahun terakhir menunjukkan peningkatan. Di Jawa dan Bali, peningkatan terjadi dari 18 kasus per 100.000 penduduk pada tahun 1998 menjadi 48 kasus per 100.000 penduduk di tahun 2000. Di luar Jawa dan Bali, terdapat peningkatan dari 1750 kasus per 100.000 penduduk pada tahun 1998 menjadi 2800 kasus per 100.000 penduduk pada tahun 2000 (Mursito, 2002).

Plasmodium falciparum adalah parasit malaria terpenting yang menyebabkan penyakit malaria tertiana atau malaria falciparum yang sering menjadi malaria yang berat dengan angka kematian yang tinggi. Infeksi oleh parasit spesies ini menyebabkan parasitemia yang meningkat jauh lebih cepat dibandingkan spesies lain. *P. falciparum* mendapat lebih banyak perhatian sejak ditemukan strain yang resisten terhadap klorokuin. Dalam pengobatan malaria, masalah resistensi terhadap obat-obat antimalaria yang terjadi terutama pada *P. falciparum* yang resisten klorokuin merupakan

masalah yang rumit, karena klorokuin dikenal sebagai antimalaria utama (Sutisna, 2004). Resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin telah menyebar hampir di semua negara di Amerika, Asia dan Afrika, tidak terkecuali di Indonesia. Kasus-kasus malaria karena *P. falciparum* yang resisten klorokuin telah dilaporkan dari semua propinsi. Masalah ini tidak bisa diabaikan, karena resisten obat pada parasit malaria di Indonesia akan menjadi bertambah buruk jika tidak ditangani dengan lebih serius (Sutisna, 2004).

Dalam usaha menemukan anti malaria alternatif, obat tradisional telah menjadi obyek penelitian yang menarik bagi para peneliti pada dasawarsa terakhir ini (Mustofa, 2003). Salah satu tanaman obat untuk mengobati malaria yang digunakan sebagai obat tradisional adalah tanaman meniran (*Phyllanthus niruri*, L) dan buah pare (*Momordica charantia*, L). Kandungan kimia dari tanaman meniran yang berkhasiat sebagai antimalaria telah diteliti yaitu, nirurin (5, 6, 7, 4'-tetrahidroksi-8-(3-metilbut-2-enil)-flavanon-5-O-rutinosida). Tanaman meniran juga mempunyai kandungan golongan senyawa flavonoid, kuersetin, kuersitrin, isokuersitrin, astragalin, rutin, kamperol -4'-ramnopiranosida, eriodiktiol-7-ramnopiranosida, fisetin. Kandungan zat berkhasiat sebagai obat pada buah pare antara lain adanya jenis alkaloid seperti momordisin, momordin, kukurbitasin, rubitasin, asam trikosapat, resin, asam resinat, saponin, vitamin C dan A, serta sedikit minyak lemak (Sudarsono dkk, 2002). Meskipun zat berkhasiat telah banyak diteliti, namun aktivitas buah pare sebagai anti malaria belum banyak dibuktikan secara ilmiah.

Berdasarkan pada pemikiran bahwa obat tradisional perlu dikembangkan untuk menunjang taraf kesehatan masyarakat terutama untuk mengobati penyakit malaria, maka penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui aktivitas antiplasmodium dari buah pare secara

in vitro terhadap kultur *P. falciparum* resisten klorokuin.

Metode Penelitian

Bahan

Bahan penelitian terdiri dari buah pare (*M. charantia*, Linne) yang diperoleh dari Kulon Progo (September 2004) dan tanaman meniran (*P. niruri*, L) sebagai kontrol positif. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah kloroform, metanol (tehnis) dan akuadest. Bahan uji antiplasmodium adalah strain *P. falciparum* resisten klorokuin (FCR-3) dan dibiakkan secara *in vitro* sebagai parasit uji, media biakan yang terdiri dari RPMI 1640 merupakan medium yang baik dari garam, asam amino, glukosa, mineral dan indikator pada konsentrasi yang optimum. Larutan NaHCO₃ dan larutan HEPES, merupakan sistem buffer yang berfungsi untuk mempertahankan pH medium 7,2-7,4. Sel darah merah (RBC), serum manusia dari golongan darah O, Gentamisin sebagai antibiotik biakan, Giemsa 20% dan akuabidest.

Alat

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat inkubator untuk biakan plasmodium, mikropate 96 sumuran, kultur flask, tabung sentrifuge 15 ml dan 50 ml, ependorf, sentrifuge, waterbath untuk memanaskan bahan (37°C), mikroskop dengan perbesaran 100x, filter 0,22 µl, yellow tips dan blue tips, mikropipet 200 µl dan 1 ml, candle jar.

Jalan Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak.

Dua ratus gram serbuk buah pare yang telah dikeringkan dimaserasi dengan 1 L kloroform dengan diaduk selama 3 jam dan didiamkan selama 24 jam. Maserat disaring

menggunakan corong *Buchner* agar zat aktif dapat tersari dengan sempurna. Penyarian dilakukan sebanyak empat kali. Sari yang diperoleh diuapkan dengan *rotaevaporator* dengan suhu 70° C. Ekstrak kloroform diuapkan dengan bantuan *hair dryer* hingga tidak berbau kloroform lagi. Ekstrak ini kemudian ditimbang dan disebut ekstrak kloroform (6,7 gram ekstrak kloroform). Ampas dari penyarian pertama kemudian dimaserasi lagi dengan metanol. Proses penyarian dengan metanol perlakuannya sama seperti pada penyarian dengan kloroform (diperoleh 5,1 gram ekstrak metanol). Ampas hasil penyarian metanol di maserasi dengan air (akuadest), diuapkan sampai kental dengan menggunakan penangas air (diperoleh 4,8 gram ekstrak air)

2. Perlakuan Terhadap Kultur Plasmodium

Strain *P. falciparum* yang resisten klorokuin (FCR-3) dikultur dengan metode *candle jar* (Trager dan Jensen, 1976). Sel darah merah yang terinfeksi parasit dibiakan dalam kultur *flask* yang mengandung 10ml medium komplit (mengandung 10 ml serum), dengan hematokrit 1,5%. Manipulasi kultur dilakukan dalam *Laminar Air Flow* dalam kondisi steril, kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada temperatur 37 °C. Medium diganti dengan yang baru setiap 24 jam masa inkubasi. Apabila parasitemia terlalu tinggi (lebih dari 10%), maka dibuat subkultur dengan menambahkan sel darah merah sehingga parasitemia menjadi rendah (kurang dari 10%) dan siap untuk uji antiplasmodium.

Untuk uji antiplasmodium, parasit yang digunakan adalah stadium ring. Untuk memperolehnya parasit harus disinkronisasi dengan larutan sorbitol 5%. Parasit malaria disentrifugasi selama 10 menit dengan

kecepatan 1000 rpm. Cairan supernatan dibuang kemudian endapan parasit direndam dengan larutan sorbitol sebanyak 3x volume parasit dan didiamkan pada suhu kamar 10 menit. Selama parasit stadium skizon akan lisis dan meninggalkan stadium trophozoit. Parasit kemudian dicuci dengan menambahkan medium komplit sebanyak 5x volume. Kemudian endapan parasit yang hanya terdiri dari stadium ring akan diperoleh dengan memutar seperti cara sebelumnya. Parasit kemudian dikembalikan ke dalam kultur dan akan menjadi skizon dalam waktu 24 jam.

3. Uji Aktivitas Antiplasmodium Secara *in vitro*

Aktivitas antiplasmodium diperiksa setelah dilakukan perlakuan secara *in vitro* pada kultur plasmodium selama 48 jam. Pemeriksaan yang dilakukan berupa pemeriksaan mikroskopis yaitu dengan pembuatan apusan dengan pewarnaan Giemsa. Sediaan apusan dibuat kemudian digenangi metanol hingga mengering atau sekitar 5-10 menit. Sediaan digenangi dengan cat Giemsa selama 20-25 menit kemudian dibilas dengan air kran kemudian dikeringkan pada udara biasa. Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan perbesaran 100x. Pada pemeriksaan, dihitung parasitemia tiap sediaan per 1000 eritrosit oleh 3 orang sukarelawan yang independen. Setelah didapatkan hasil persen parasitemia, kemudian dihitung persen penghambatan parasit. Dari data tersebut dicari kadar ekstrak yang mampu menghambat hingga 50% parasitemia (IC₅₀).

Cara menghitung persentase parasitemia dan persentase penghambatan parasit :

$$\% \text{parasitemia} = \frac{\text{Jumlah skizon}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan parasit} = \left[\frac{1 - \text{Jumlah skizon perlakuan}}{\text{Jumlah skizon kontrol negatif}} \right] \times 100\%$$

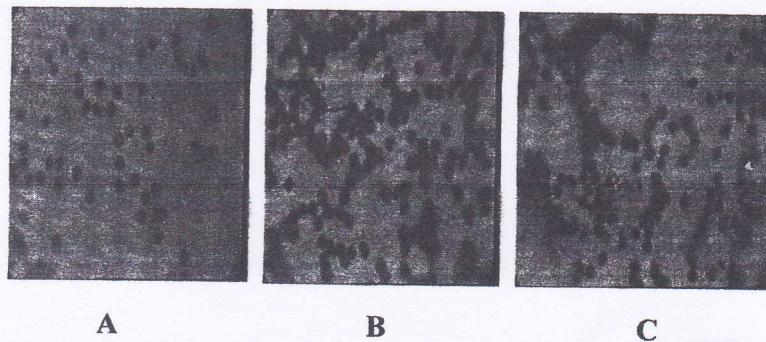
Hasil dan Pembahasan

Pengukuran persentase parasitemia berdasarkan angka parasitemia per 1000 eritrosit dilihat dari adanya skizon dalam eritrosit yang menandakan bahwa terjadi infeksi parasit. Dalam eritrosit bentuk cincin dengan kromatin ganda dapat ditemukan pada *P. falciparum* dan dapat membantu diagnosis parasit. Bentuk skizon muda *P. falciparum* dapat dikenal dengan adanya satu atau dua pigmen yang menggumpal. Sedangkan pada skizon matang, akan mengisi kira-kira dua per tiga eritrosit dan membentuk 8 sampai 28 buah merozoit.

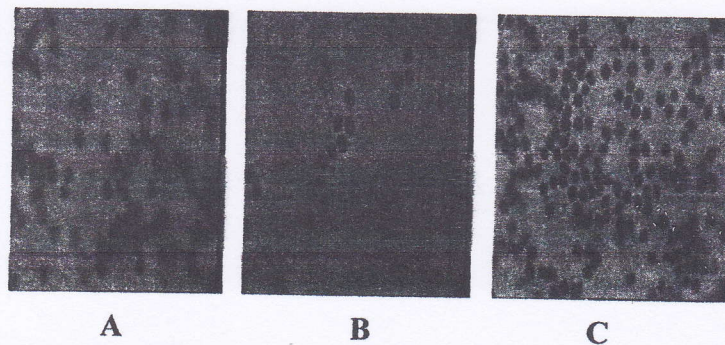
Pada kontrol positif ekstrak air meniran dapat dilihat jumlah skizon lebih sedikit

penghambatan parasit lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak metanol dan kloroform meniran.

Pada perlakuan dengan ekstrak kloroform buah pare, dapat dilihat bahwa jumlah skizon lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan ekstrak metanol dan air buah pare. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan parasit ekstrak kloroform relatif lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak metanol dan air. Jumlah skizon pada ekstrak metanol dan air yang lebih banyak menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan parasit ekstrak metanol dan air relatif lebih lemah. Bentuk skizon dalam eritrosit dengan pemberian ekstrak kloroform, metanol dan air dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 1 : Gambar skizon dalam eritrosit yang diberi perlakuan ekstrak air (A), ekstrak metanol (B) dan ekstrak kloroform (C) kadar 500 µg/ml tanaman meniran



Gambar 2 : Gambar skizon dalam eritrosit yang diberi perlakuan ekstrak kloroform (A), ekstrak metanol (B) dan ekstrak air (C) kadar 500 µg/ml tanaman pare

dibandingkan dengan jumlah skizon pada ekstrak metanol dan kloroform meniran (Gambar1). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air meniran mempunyai aktivitas

Pada kontrol negatif, kultur tidak diberikan perlakuan selain dengan pelarut air dapat dilihat bahwa jumlah skizon paling banyak dibandingkan dengan kelompok

perlakuan dengan pemberian ekstrak kloroform, metanol dan air daun pare dan kelompok kontrol positif dengan pemberian ekstrak kloroform, metanol dan air meniran.

Data gambaran skizon diperkuat dengan data persen penghambatan parasit. Dengan pertambahan kadar ekstrak persen penghambatan parasit rata-rata meningkat baik pada kelompok kontrol positif meniran (Tabel I) maupun perlakuan ekstrak buah pare (Tabel II). Meniran dipilih sebagai kontrol positif karena meniran sudah dibuktikan secara penelitian berkhasiat sebagai antiplasmodium yang relatif

kuat dengan kandungan zat aktif nirurin. Hal ini terbukti dari nilai IC_{50} sebesar $8,515 \mu\text{g/ml}$ dari ekstrak air meniran mempunyai aktivitas antiplasmodium kategori kuat (Tabel III). Aktivitas antiplasmodium *in vitro* suatu ekstrak tanaman dapat dikelompokkan menjadi 3 kategori, yaitu :tanaman yang mempunyai aktivitas antiplasmodium *in vitro* sangat kuat yaitu yang mempunyai nilai $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$, aktivitas antiplasmodium sedang mempunyai nilai IC_{50} antara $10-49 \mu\text{g/ml}$, aktivitas antiplasmodium lemah dengan nilai $IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ (Gessler dkk, 1994).

Tabel I. Rerata persentase penghambatan pertumbuhan parasit *P. falciparum* yang diberi perlakuan ekstrak kloroform, metanol dan air tanaman meniran setelah inkubasi 48 jam

Kadar Ekstrak meniran ($\mu\text{g/ml}$)	Rerata persentase penghambatan pertumbuhan parasit <i>P. falciparum</i> berbagai kadar ekstrak meniran		
	Ekstrak Kloroform	Ekstrak Metanol	Ekstrak Air
500	$65,62 \pm 15,91$	$82,18 \pm 12,82$	$94,06 \pm 1,33$
100	$28,74 \pm 18,56$	$83,74 \pm 0,88$	$91,25 \pm 3,53$
50	$22,18 \pm 11,05$	$89,99 \pm 6,18$	$88,12 \pm 9,72$
10	$30,31 \pm 8,40$	$42,50 \pm 3,53$	$87,18 \pm 1,32$
5	$24,06 \pm 0,44$	$21,56 \pm 16,35$	$46,87 \pm 20,33$

Tabel II : Rerata persentase penghambatan pertumbuhan parasit *P. falciparum* yang diberi perlakuan ekstrak kloroform, metanol dan air tanaman pare setelah inkubasi 48 jam

Kadar Ekstrak pare ($\mu\text{g/ml}$)	Rerata persentase penghambatan pertumbuhan parasit <i>P. falciparum</i> berbagai kadar ekstrak pare		
	Ekstrak Kloroform	Ekstrak Metanol	Ekstrak Air
500	$89,47 \pm 1,65$	$89,08 \pm 2,21$	$48,90 \pm 1,65$
100	$70,74 \pm 6,07$	$16,52 \pm 5,52$	$40,70 \pm 3,31$
50	$55,53 \pm 1,10$	$18,47 \pm 10,48$	$23,54 \pm 2,21$
10	$23,15 \pm 1,65$	$11,83 \pm 6,62$	$13,01 \pm 1,65$

Tabel III : Data IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ekstrak kloroform, metanol dan air buah pare dan tanaman meniran pada kultur *P. falciparum* setelah inkubasi 48 jam

Kelompok	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	Ekstrak kloroform	Ekstrak metanol	Ekstrak air
Meniran	$191,29 \pm 32,57$	$13,04 \pm 3,85$	$8,51 \pm 3,88$
Pare	$45,07 \pm 5,56$	$92,58 \pm 18,77$	$454,23 \pm 92,81$

Dengan penelitian ini dapat dibuktikan bahwa ekstrak kloroform dari buah pare (*M. charantia*, L) memiliki aktivitas antiplasmodium yang tergolong sedang (IC_{50} 45,07 μ g/ml). Ekstrak metanol (IC_{50} 92,58 μ g/ml) dan ekstrak air (IC_{50} 454,23 μ g/ml) buah pare (*M. charantia*, L) memiliki aktivitas antiplasmodium tergolong lemah.

Kandungan dari buah pare antara lain, alkaloid (momordisin), glikosida (momordisin, karantin), asam trikosianik, resin, asam resinat, zat besi, kalsium, garam fosfat, minyak lemak yang terdiri dari asam oleat, asam linoleat, asam stearat, L-oleostearat (Dhall dkk, 1961). Diduga adanya kandungan alkaloid momordisin yang kemungkinan memberikan efek antiplasmodial.

Kesimpulan

Ekstrak Kloroform (IC_{50} 45,07 μ g/ml) buah pare (*M. charantia*, L) mempunyai aktivitas antiplasmodium sedang. Ekstrak metanol (IC_{50} 92,58 μ g/ml) buah pare dan ekstrak air (IC_{50} 454,23 μ g/ml) buah pare mempunyai aktivitas antiplasmodium lemah.

Daftar Pustaka

- Dhall, N. S, Gupta, K. C, Sastry, M. S, and Malhotra, C., L, 1961, *Chemical Compton of The Fruit of Momordica charantia*, L, hal 23, 128, Indian J. Pharm.
- Gessler, M.c., Nkunya, M. H. N., Mwasumbi, L. B., Heinrich, M., Tonner, M., 1994, Screening Tanzanian Medical Plants For Antimalarial, *Actatrop*, hal 55, 65-67.
- Mursito, B, 2002, *Ramuan Tradisional untuk Penyakit Malaria*, hal 1-3, 5-8, 18, Penerbit Swadaya, Jakarta.
- Mustofa, 2003 Molekul Antimalaria Potensi dan Tantangan Pengembangannya Sebagai Obat Baru Malaria, *Majalah Obat Tradisional*, Vol 8, No. 26, ha 8-24.
- Sudarsono, Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus, I. A., dan Purnama, 2002, *Hasil Penelitian, sifat-sifat dan Penggunaan Tumbuhan Obat II*, Cetakan 1, hal 98-99, Pusat Studi Obat Tradisional Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sutisna, P., 2004, *Malaria Secara Ringkas Dari Pengetahuan Dasar Sampai Terapan*, hal 8, 71-74, EGC, Jakarta.